

姜黄素诱导人食管癌 EC9706 细胞凋亡过程中核磷蛋白的表达与定位变化

石松林¹ 陈兰英² 刘用金¹ 杨海波² 路锐¹ 杨玲¹ 李祺福^{1*}

(1. 厦门大学医学院基础医学部 福建 厦门 361102; 2. 河南城建学院生命科学与工程学院 河南 平顶山 467036)

[摘要] 目的 探讨核磷蛋白 NPM 在癌细胞诱导凋亡过程中在细胞内、细胞核基质上的定位与表达变化,以及 NPM 与凋亡调控相关蛋白的关系,探索其在凋亡调控中的作用。方法 在姜黄素诱导人食管癌 EC9706 细胞凋亡的基础上,以亚细胞蛋白质组学方法分析 NPM 在核基质中的存在与变化,并以免疫印迹法杂交实验进行验证;激光扫描共聚焦显微镜观察 NPM 在 EC9706 细胞凋亡过程中的定位与变化,以及 NPM 与 Bax、Bcl-2 等基因产物的共定位关系。结果 NPM 存在于 EC9706 细胞核基质蛋白组分中,并在姜黄素处理后表达下调。NPM 在 EC9706 细胞凋亡过程中发生显著的胞质-核之间的穿梭定位变化,并与 Bax、Bcl-2 等蛋白具有共定位关系,且共定位区域发生了变化。结论 NPM 是一种核基质结合蛋白,在 EC9706 细胞凋亡中的表达与定位变化,及其与凋亡调控蛋白的共定位关系提示,它在 EC9706 细胞凋亡调控中具有重要作用。

[关键词] 核磷蛋白;姜黄素;核基质;食管癌;免疫印迹法;人

[中图分类号] R735.1; Q291 **[文献标志码]** A **[DOI]** 10.3969/j.issn.0529-4356.2014.02.014

Expression and localization changes of nucleophosmin during apoptosis of human esophageal cancer EC9706 cells induced by curcumin

SHI Song-lin¹, CHEN Lan-ying², LIU Yong-jin¹, YANG Hai-bo¹, LU Kun¹, YANG Ling¹, LI Qi-fu^{1*}

(1. Department of Basic Medicine, Medical College of Xiamen University, Fujian Xiamen 361102, China;

2. College of Life Science and Engineering, He'nan University of Urban Construction, He'nan Pingdingshan 467036, China)

[Abstract] **Objective** To explore the expression and localization change of nucleophosmin (NPM) in the nuclear matrix of cancer cells and its relationships with apoptosis regulating proteins during induced apoptosis, and to discuss its regulating functions in apoptosis. **Methods** Curcumin was used to induce apoptosis of human esophageal cancer EC9706 cells. By using subcellular proteomics technology we analyzed the presence and expression change of NPM in the nuclear matrix. We performed a Western blotting analysis to confirm the change. Subsequently, we examined the localization change of NPM and its co-localization with apoptotic gene products such as Bax and Bcl-2 through laser scanning confocal microscopy. **Results** The results of this study showed that NPM existed in the nuclear matrix of EC9706 cells with a remarkable down-regulation after curcumin treatment. We demonstrated that NPM exhibited a distinct nucleocytoplasmic shuttling during induced apoptosis. NPM was co-localized with Bax, Bcl-2 and their co-localization regions changed during the process of apoptosis. **Conclusion** NPM is a nuclear matrix associated protein. Its altered expression and localization, as well as its co-localization with apoptosis regulating proteins suggest the important regulative functions in apoptosis of EC9706 cells.

[Key words] Nucleophosmin; Curcumin; Nuclear matrix; Esophageal cancer; Western blotting; Human

[收稿日期] 2013-05-20 **[修回日期]** 2013-06-21

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(81071669, 81272921, 81272245)

[作者简介] 石松林(1974—),男(汉族),安徽省凤阳县人,副教授。

* 通讯作者(To whom correspondence should be addressed)

E-mail: chifulee@xmu.edu.cn Tel: (0592) 2185363

核磷蛋白(nucleophosmin, NPM 或 B23), 是一种多功能的磷酸化蛋白质, 参与核糖体的生物合成, DNA 修复与转录, 中心体复制控制, 具有分子伴侣作用, 并可通过多种信号通路调节细胞增殖和凋亡^[1-3], 与多种肿瘤的发生有关^[4]。NPM 在细胞生命活动中发挥着重要的作用, 不同的细胞类型或不同的蛋白质表达水平下 NPM 发挥着癌基因或抑癌基因的双重作用^[5-6]。NPM 的异常表达和定位通过不同的机制参与肿瘤发生、发展的调控^[7-8]。NPM 可以通过抑制凋亡途径促进细胞存活, 从而影响肿瘤的发生^[9]。然而目前 NPM 在肿瘤细胞凋亡过程中的作用及其调控机制问题尚不明确。细胞核基质是细胞核内非组蛋白构成的精细网络结构, 上面结合了众多调控细胞增殖、分化与凋亡调控的关键调控因子, 是细胞重大生命活动的调控中心。本实验在应用姜黄素诱导人食管癌 EC9706 细胞凋亡研究工作的基础上^[10, 11], 对 NPM 在 EC9706 细胞核基质中的存在、定位与表达变化, 以及 NPM 与凋亡相关蛋白的相互关系进行了研究, 以期能够进一步阐明细胞增殖与凋亡过程中 NPM 的调节作用机制。

材料和方法

1. 材料

人食管癌 EC9706 细胞购自中国科学院细胞库, 小鼠抗人 NPM 抗体均购自 NeoMarkers 公司, 山羊抗兔 IgG-FITC、山羊抗小鼠 IgG-TRITC、兔抗人 Bax 抗体、兔抗人 Bcl-2 抗体均购自 Santa Cruz 公司, RPMI-1640 培养基为 Gibco 公司产品, Sofast 转染试剂购自厦门太阳马生物工程有限公司, 新生牛血清为杭州四季青生物工程材料有限公司产品, 姜黄素购自中国药品生物制品检定所。

2. 细胞培养和凋亡诱导处理

EC9706 细胞培养于 RPMI-1640 培养液中(内含 10% 小牛血清和 1.0×10^5 IU/L 青霉素、 1.0×10^5 IU/L 链霉素及 50 mg/L 卡那霉素, pH7.2), 于 37℃、5% CO₂ 培养箱中培养。姜黄素用 DMSO 溶解, 贮存液浓度为 10g/L, -20℃ 避光保存。取对数生长期的 EC9706 细胞进行消化传代, 接种 24h 更换含 7.5mg/L 姜黄素的培养液进行诱导处理, 连续培养 72h 后收集细胞备用。对照组细胞用不含姜黄素的 DMSO 平行处理, 细胞收集备用。

3. 核基质蛋白的提取

核基质选择性抽提方法参见文献^[11, 12], 经修改后简述如下。收集对照组与处理组细胞, 分别加入细胞骨架提取液(cytoskeleton, CSK) 100 [10mmol/L 哌嗪-4-二乙磺酸(PIPES), 300mmol/L 蔗糖, 100mmol/L NaCl, 3mmol/L MgCl₂, 1mmol/L 乙

二胺-四乙酸(EGTA), 2mmol/L 苯甲基磺酰氟(PMSF), 0.5% TritonX-100], 0℃ 孵育 10min, 400 × g 离心 5min, 弃上清液。沉淀中加入细胞骨架提取液 CSK50(10mmol/L PIPES, 300mmol/L 蔗糖, 50mmol/L NaCl, 3mmol/L MgCl₂, 1mmol/L EGTA, 2mmol/L PMSF, 0.5% TritonX-100) 洗涤 2 次, 离心, 去除上清液。加入 4.0×10^5 IU/L DNase I (CSK50 配制) 室温消化 30min, 滴加 1mol/L 硫酸铵至终浓度 0.25mol/L, 室温孵育 15min, 1000 × g 离心 5min, 不溶性沉淀物的成分即为核基质蛋白, CSK50 漂洗 1 次, 于 -80℃ 储存备用。

4. 双向凝胶电泳与图像分析

常规方法进行双向电泳, 以质谱兼容的硝酸银染色法染色, 对 3 个重复实验与对照组凝胶图像蛋白点的检测、定量分析、差异比较及统计学分析均通过凝胶图像分析软件 PDQuest 8.0 (Bio-Rad 公司) 进行。各蛋白点的吸光度(absorbance, A) 值相对凝胶上所有蛋白总密度进行了标准量化, 对不同重复组凝胶蛋白点的 A 值以 SPSS 17.0 软件进行统计学分析, 平均相对 A 值变化超过 2 倍, 且 $P < 0.05$ 的蛋白点定义为差异表达的蛋白点。

5. 核基质蛋白的质谱鉴定

挖取差异表达的蛋白质点, 经漂洗、脱色、二硫苏糖醇(DL-dithiothreitol, DTT) 还原、碘乙酰胺烷基化、干燥、胶内酶解、肽段抽提与浓缩等步骤后, 通过 ReFlexTM III 型 MALDI-TOF 质谱仪(Bruker 公司) 获取酶解蛋白的肽指纹(peptide mass fingerprinting, PMF) 数据。数据经分析软件 flexAnalysis 2.0 进行处理, 消除质谱误差与污染峰。最后在 MASCOT (www.matrixscience.com) 蛋白质组数据库中进行查询鉴定。

6. Western blotting 检测

收集对照组和处理组细胞, 按前述方法提取核基质蛋白, 并抽提全细胞蛋白质。蛋白样品以 12% SDS-PAGE 分离后转移至 PVDF 膜上。4% 牛血清清蛋白(BSA) 封闭, 然后加入 1:2000 稀释的一抗(鼠抗人核仁磷酸蛋白 1, 4% BSA 配制), 室温下振荡孵育 1.5h, TBST 洗膜 3 次, 每次 10min; 加入 HRP 标记的二抗(兔抗鼠 4% BSA 配制, 1:10 000 稀释), 室温条件下振荡孵育 1.5h, TBST 洗膜 3 次, 每次 10min。增强化学发光法检测并记录。

7. 绿色荧光蛋白(green fluorescent protein, GFP) 融合蛋白观察姜黄素对 NPM 细胞定位的影响

收集 EC9706 细胞, 抽提 RNA 后反转录为 cDNA, 以 NPM 引物(上游: 5' GGCCGCTCGAG TT AT-GGAAGATTCGATGGACAT; 下游: 5' GCGCGG-GATCCTTA AAGAGACTTCCTCCACTG) PCR 实验克

隆 NPM 蛋白编码序列(CCDS 4376.1 885 nt) ,XhoI 和 BamHI 内切酶双酶切后插入 pEGFP-C1 真核表达载体 ,构建 GFP-NPM 融合蛋白的表达质粒 pEGFP-NPM。pEGFP-NPM 经测序验证构建成功后 ,用 Endo-free Plasmid Mini Kit 提取真核表达质粒 ,用紫外分光光度计测定质粒的浓度和纯度。转染实验中 ,细胞汇合度应达到 70% ~ 80%。转染前 1h 细胞更换成无血清、无抗生素的 RPMI-1640 培养液。转染试剂 Sofast 按说明书进行转染操作。37℃ 培养 5 ~ 6h 后 ,换成含有 10% 小牛血清的培养液。培养 24h 后 ,荧光显微镜观察 NPM 在细胞内的定位情况。以姜黄素诱导处理转染细胞 ,经 24h 后荧光显微镜观察 GFP-NPM 在细胞内的定位变化。

8. 激光扫描共焦显微镜样品的制备与观察

取长有对照组和处理组细胞的盖玻片 ,PBS 漂洗 3 次 ,每次 5min; Karnovsky 溶液中固定 20min , PBS 漂洗 3 次 ,每次 5min; 用 0.5% TritonX-100 的透化试剂(PBS 配制) 室温透膜 20min ,PBS 漂洗 3 次 ,每次 5min。5% BSA 室温封闭 1 h。以 3% BSA 配制一抗作用液(NPM 稀释 100 倍 ,Bax、Bcl-2 各稀释 200 倍) 。设制抗体组合: 鼠抗 NPM/兔抗 Bax、鼠抗 NPM/兔抗 Bcl-2。各加 40μl 相应一抗稀释液至玻片上 ,室温孵育 30min 4℃ 孵育过夜 ,PBS 漂洗 3

次 ,每次 5min。配制相应组合的荧光素标记二抗作用液(CY3 标记的羊抗鼠与 FITC 标记的羊抗兔二抗) ,各取 30μl 二抗作用液加到玻片上 ,室温避光孵育 30min 4℃ 孵育 3 h ,漂洗后抗荧光淬灭剂封片。按上述方法 ,以 PBS 代替一抗 ,其他步骤相同 ,平行制备阴性对样品。TCS-SP2 MP 型激光扫描共焦显微镜观察结果。

结 果

1. 双向凝胶电泳与图像分析结果

对照组 EC9706 细胞与姜黄素处理组细胞提取的核基质蛋白双向电泳均设置 3 块重复胶 ,采用凝胶图像分析软件 PDQuest 8.0 对采集到的双向电泳图像进行相对定量分析。图 1A 中的 L7 是鉴定为 NPM 的蛋白质点。图 1B 为 NPM 的蛋白质点局部放大图像 ,图 1C 显示了 NPM 的蛋白质点在处理前后细胞核基质上的表达量差异约为 1:0.22(35 000: 8000) 。

2. MALDI-TOF 质谱分析与数据库检索结果

差异表达的蛋白点经 MALDI-TOF 质谱的肽指纹数据分析与数据库检索 ,鉴定差异表达的蛋白质点 L7 为 NPM 蛋白 ,其分子量及等电点理论值与双向电泳实验观察结果基本相符(表 1) 。

表 1 NPM 蛋白点经 MASCOT 数据库检索鉴定结果

Table 1 NPM Protein identified by using MASCOT database (www.matrixscience.com)

蛋白点编号 Spot No.	蛋白质名称 protein name	检索号 accession No.	理论分子量 Mol. Mass calc(D)	理论等电点 pI (calc)	得分 score	匹配肽段数 matching peptides
L7	核磷蛋白 NPM	gi114762	32726	4.64	73	8

3. 免疫印迹法结果分析

经 SDS-PAGE 电泳分离与半干式转膜方式将蛋白转移到 PVDF 膜上进行 Western blotting 分析。阴性对照组以不含一抗的孵育液代替一抗进行孵育 ,应用增强化学发光法进行蛋白检测。阴性对照未见蛋白条带; 各标本与相应抗体反应后 ,仅在待测蛋白分子量附近有反应条带 ,显示抗体特异性好。Western blotting 结果经图像分析软件 Quantity One 4.6 定量分析后显示 ,全细胞蛋白组分中姜黄素处理使 EC9706 细胞的 NPM 的表达略有升高(1:1.256) ;在核基质蛋白样品中 ,姜黄素使核基质上的 NPM 比例显著降低(1:0.118) (图 2) 。

4. NPM 蛋白在姜黄素诱导 EC9706 细胞凋亡前后的细胞定位变化

荧光显微镜观察显示 ,GFP-NPM 蛋白在质粒转染表达后的 EC9706 细胞中主要定位于核仁位置 ,核质表达较少 ,胞质区未见明显表达定位; 经姜黄素处

理 24h 后 ,GFP-NPM 蛋白在细胞内定位发生显著变化 ,核仁绿色荧光强度降低 ,核质区及胞质区分布大量 GFP-NPM 的荧光信号。提示姜黄素处理使 NPM 由原来的核仁定位穿梭到核质及细胞质区(图 3) 。

免疫荧光标记激光扫描共焦显微镜观察显示 ,人食管癌 EC9706 细胞中 ,内源表达的 NPM 蛋白的红色荧光主要分布于核内区域 ,细胞质内也有微弱荧光分布(图 4B 4H) ;经姜黄素处理后 ,细胞中红色荧光定位发生变化 ,核内 NPM 表达显著减少 ,红色荧光主要分布在细胞质内点状分布 ,在细胞质靠近核膜的区域内荧光较强(图 4E 4K) 。

5. NPM 蛋白与凋亡相关蛋白 Bcl-2、Bax 在细胞内的共定位关系

用鼠抗人 NPM 抗体分别和 Bcl-2、Bax 等抗体配对组合 ,用相应的荧光标记二抗对 EC9706 细胞进行双重免疫荧光染色 ,NPM 以红色荧光染料 CY3 标记 ,其他抗体以绿色荧光染料 FITC 标记 ,激光扫

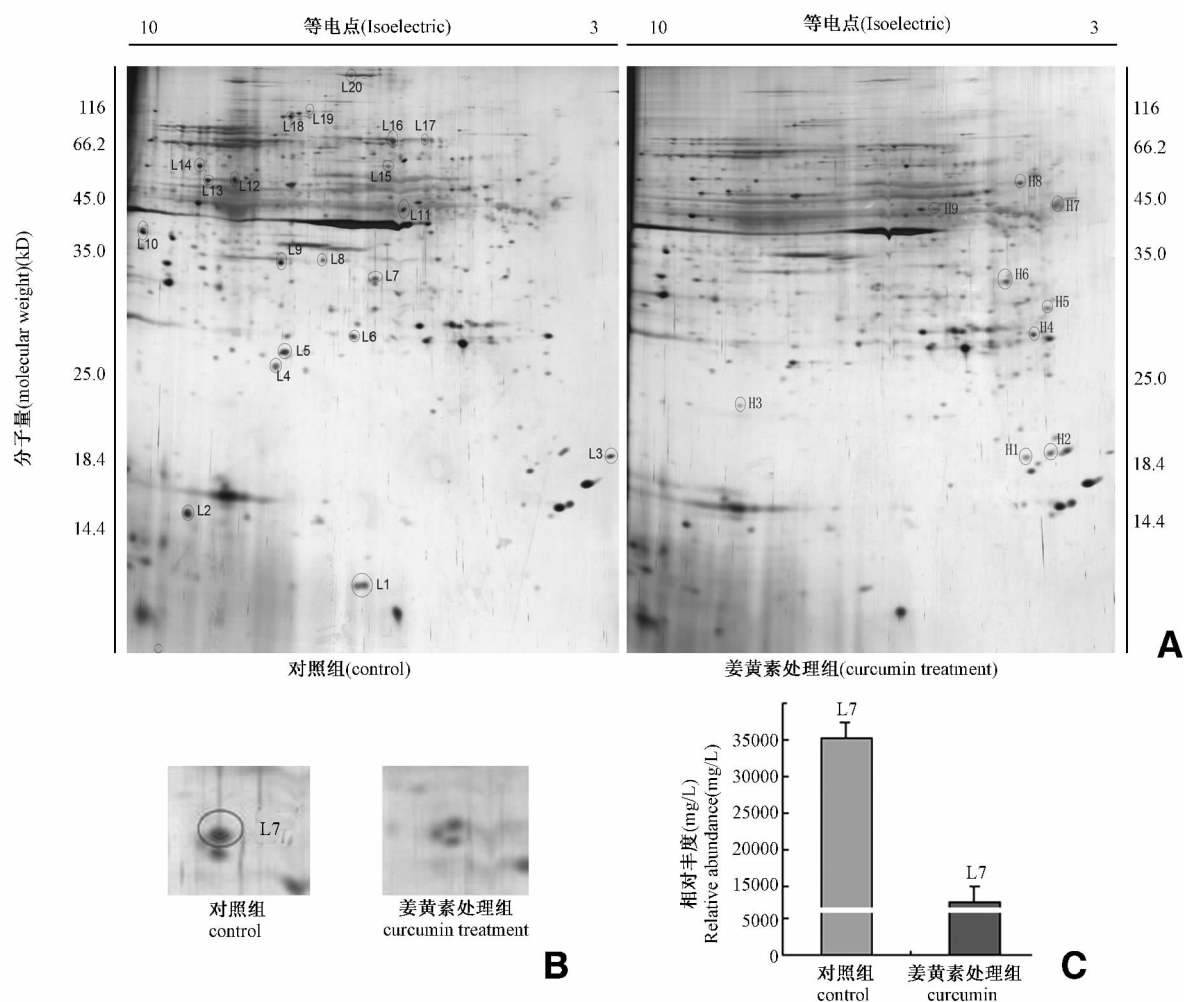


图1 双向凝胶电泳图像分析 EC9706 细胞核基质蛋白变化(银染)

A. 姜黄素处理前后 EC9706 细胞核基质蛋白双向电泳图; B. 鉴定为 NPM 的蛋白点 (L7) 的放大图像; C. 凝胶图像分析软件 PDQuest 8.0 对 NPM 蛋白点的相对定量分析

Fig.1 2-D PAGE gels of nuclear matrix proteins from EC9706 cells (silver staining). A, 2-D PAGE gels of nuclear matrix proteins from EC9706 cells before and after curcumin treatment; B, Enlarged maps of changed expression of NPM (spot L7) from EC9706 cells; C, Relative expression level of NPM in nuclear matrix with PDQuest 8.0 software

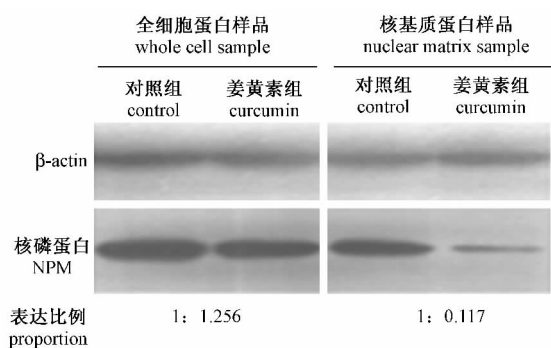


图2 Western blotting 实验显示,姜黄素诱导 EC9706 细胞凋亡前后 NPM 在细胞蛋白及核基质蛋白组分中的表达变化

Fig.2 The results of Western blotting showed the expression of NPM in the whole cell proteins and nuclear matrix proteins from EC9706 cells before and after curcumin treatment

描共焦显微镜观察 NPM 及相应蛋白的定位关系及其变化,两者共定位部位叠加后为黄色或橙黄色

(图4)。阴性对照没有观察到荧光,显示抗体标记过程基本无非特异性标记反应。

5.1 NPM 与抑凋亡蛋白 Bcl-2 在 EC9706 细胞内的共定位关系:免疫荧光标记观察显示,人食管癌 EC9706 细胞中 Bcl-2 的绿色荧光在整个细胞内都有分布,荧光强度不均一,细胞质中靠近核膜区域荧光较强,核质中的荧光较弱。叠加荧光显示 NPM 和 Bcl-2 在细胞核内尤其是靠近核膜区域有微弱的共定位关系。姜黄素处理后, Bcl-2 的荧光强度较处理前有所减弱,细胞核中的荧光相对较强,细胞质区域内荧光强度较弱,呈放散状分布。但 NPM 和 Bcl-2 叠加荧光显示在细胞质中存在明显的共定位关系。提示两者的共定位有由核质向胞质转移的趋势(图4C、4F)。

5.2 NPM 与促凋亡蛋白 Bax 在 EC9706 细胞内的共定位关系:免疫荧光标记观察显示,人食管癌 EC9706 细胞中 Bax 的绿色荧光在整个细胞中都有

分布,细胞核与细胞质靠近核膜区域荧光较强,其余部位荧光相对较弱,呈放散状分布。叠加荧光显示 NPM 和 Bax 主要在核质靠近核膜区域有微弱的共定位荧光。经姜黄素处理后的 EC9706 细胞中, Bax 的绿色荧光在核质中的分布明显增多,特别是靠近

核膜区域荧光强度高。叠加荧光显示 NPM 与 Bax 在细胞质和核质靠近核膜区域都存在明显共定位关系,其余区域共定位关系不明显。提示两者的共定位有由核质向胞质转移的趋势(图 4I, 4L)。

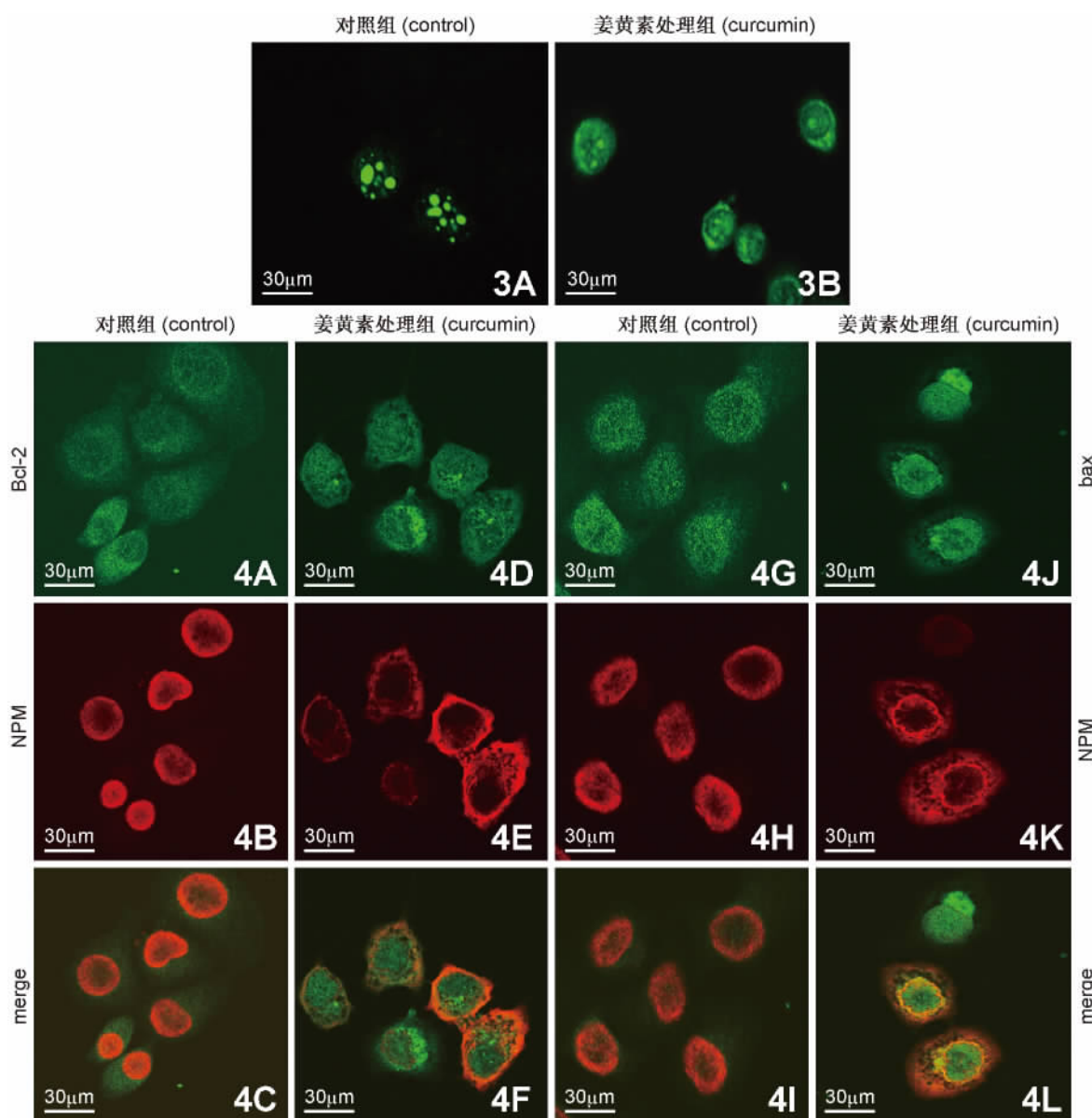


图3 荧光显微镜观察姜黄素处理前后 GFP-NPM 融合蛋白的定位变化

GFP-NPM 在姜黄素处理 EC9706 细胞后,从细胞核仁位置(A) 转移到核质及胞质区(B) 标尺示 30 μm

图4 激光扫描共聚焦显微镜观察显示 NPM 与 Bcl-2 及 Bax 在 EC9706 细胞中的定位与共定位变化

NPM 以红色荧光染料 CY3 标记, Bcl-2 和 Bax 以绿色荧光染料 FITC 标记 标尺示 30 μm

Fig. 3 Fluorescence microscope showed the altered localization of GFP-NPM

GFP-NPM translocated from nucleolus (A) to nucleoplasm and cytoplasm (B) on the treatment of Curcumin in EC9706 cells ,Bar = 30 μm

Fig. 4 Laser scanning confocal microscope showed the altered localization of NPM and the altered colocalization between NPM and Bcl-2 and Bax

in EC9706 cells NPM was labeled with red fluorescein CY3 ,Bcl-2 and Bax was labeled with green fluorescein FITC ,Bar = 30 μm

讨 论

1. NPM 在 EC9706 细胞凋亡过程中的表达、定位变化

NPM 在生物体中发挥着重要的作用,它主要定

位于核仁并通过在亚细胞器之间快速穿梭参与多项细胞过程。本研究显示,姜黄素诱导人食管癌 EC9706 细胞凋亡后, NPM 在全细胞的表达并没有发生显著变化(略有升高)。前人研究显示, 5 ~ 30 μmol/L 的姜黄素显著且剂量依赖性的促进非转

化细胞 NIH 3T3 中 NPM 的表达升高,但 HeLa 和 F9 等转化细胞中则没有变化^[13]。我们这是第一次发现姜黄素在转化细胞中升高了 NPM 的表达水平。本研究的双向电泳定量分析及 Western blotting 实验结果定量分析进一步显示,姜黄素处理后细胞核基质上的 NPM 比例显著降低,提示 NPM 在姜黄素处理后从核基质上穿梭到胞质区域。为了进一步验证 NPM 在姜黄素处理前后的定位变化,我们构建了 GFP-NPM 融合蛋白,在生理状态下观察到 NPM 在姜黄素处理后从核仁位置到细胞核质及胞质区的穿梭变化。我们推测,NPM 在细胞核内抑制了相应的促凋亡蛋白如 p53 的活性,维持细胞的生存,而经姜黄素处理后,NPM 穿梭到细胞质激活了下游的促凋亡蛋白,起到了加快凋亡进程的作用。NPM 在细胞内的异常定位变化的分子机制目前尚未阐明,尽管有证据显示白血病中由于 NPM 插入突变使 C 末端的核仁定位信号变成核输出信号^[14],但目前实体瘤细胞中尚未发现 NPM 序列的突变^[5]。我们前期构建融合 NPM 过程中的测序结果也显示,NPM 在 EC9706 细胞中没有发生突变。因此,姜黄素诱导 NPM 发生定位变化的机制尚待进一步探索研究。

2. NPM 与凋亡相关基因产物的共定位关系及其在 EC9706 细胞凋亡过程中的变化

NPM 是一种核仁磷酸化蛋白,在细胞内主要发挥分子伴侣的作用,研究表明,NPM 能够在细胞核和细胞质之间穿梭,在细胞凋亡过程中起重要调控作用。本实验结果表明,对照组细胞中,NPM 和 Bcl-2 在细胞核核周存在一定的共定位关系。而在姜黄素处理后的细胞中,共定位区域主要位于胞质,荧光较强。目前关于 NPM 和 Bcl-2 相互作用的研究尚无报道。Bcl-2 在凋亡过程中主要是作为负调控子发挥作用。研究显示,Bcl-2 使 p53 在 G₁ 期持续定位于胞质而不进入细胞核,从而无法发挥其功能,抑制了白血病细胞的凋亡^[15]。Beham 等^[16]在人前列腺癌 LNCaP 细胞系中,也发现 Bcl-2 可以抑制 DNA 损伤后的 p53 介导的细胞凋亡以及 p53 蛋白的核运输^[16]。Bcl-2 的特异酶解需 Caspase3 的激活;并发现 Bcl-2 的裂解产物主要定位于线粒体区,从而导致细胞色素 C 释放入胞质^[17]。Caspase 3 对 Bcl-2 的酶解不仅抑制了其抗凋亡的活性,而且还产生了具有促凋亡活性的片段,从而构成了凋亡的阳性反馈环路。

因此,NPM 和 Bcl-2 在细胞凋亡过程中通过与关键凋亡调控因子的相互作用阻滞或促进细胞凋亡的进程。本实验的激光扫描共焦显微镜显示,NPM 和 Bcl-2 在姜黄素诱导前后都有一定的共定位,并且姜黄素诱导处理后有从核周向胞质转移的趋势。

我们推测 NPM 和 Bcl-2 存在相互作用,再通过其他调控因子(如 p53)调控细胞凋亡过程。

激光扫描共焦显微镜观察还显示,在对照组细胞中,NPM 与 Bax 在细胞内的共定位区域主要位于细胞核和靠近核膜区域,荧光强度较强,而经姜黄素诱导处理后,NPM 与 Bax 的共定位区域主要位于胞质,荧光较弱,但核膜区域有非常显著的共定位荧光,提示在姜黄素诱导 EC9706 细胞凋亡过程中,NPM 与 Bax 之间可能有相互作用关系。

Bax 是 Bcl-2 蛋白家族中的一员,具有促凋亡作用。有研究显示,NPM 和 Bax 之间的相互作用对 Bax 的活化与转运起着关键作用^[18],经非离子去污剂 NP-40 诱导 Bax 构象改变之后,Bax 的 C 端才能与 NPM 结合,且 Bcl-2 和 p53 都会抑制活化的 Bax 和 NPM 之间的相互作用。因此,NPM 和 Bax 之间存在相互作用,调控 Bax 的活化与转运,进而调控凋亡的进程。本实验结果表明,NPM 和 Bax 在姜黄素诱导前后都有一定的共定位,并且有从细胞核向细胞质转移的趋势。NPM 在姜黄素作用后亚细胞定位及其与 Bax 共定位发生明显变化的特征,提示 NPM 在细胞凋亡过程中可能作为一个重要的调控子。因此对 NPM 和 Bax 的相互作用进行深入研究,对于阐明姜黄素诱导肿瘤细胞凋亡的分子机制提供重要的科学依据。

综上所述,本实验揭示了 NPM 蛋白在姜黄素诱导食管癌 EC9706 细胞凋亡过程中的细胞核-质穿梭定位与表达变化,并进一步发现了 NPM 与凋亡相关蛋白 Bcl-2 及 Bax 在细胞内的共定位关系与变化,为探索 NPM 参与肿瘤细胞凋亡调控机制提供了科学依据。

参 考 文 献

- [1] Khandelwal N, Simpson J, Taylor G, et al. Nucleolar NF-kappa B/RelA mediates apoptosis by causing cytoplasmic relocation of nucleophosmin[J]. *Cell Death Differ*, 2011, 18(12): 1889-1903.
- [2] Dhar SK, St Clair DK. Nucleophosmin blocks mitochondrial localization of p53 and apoptosis[J]. *J Biol Chem*, 2009, 284(24): 1609-1618.
- [3] Qi W, Shakalya K, Stejskal A, et al. NSC348884, a nucleophosmin inhibitor disrupts oligomer formation and induces apoptosis in human cancer cells[J]. *Oncogene*, 2008, 27(30): 4210-4220.
- [4] Li QF, Shi SL, Liu QR, et al. Anticancer effects of ginsenoside Rg1, cinnamic acid, and tanshinone IIA in osteosarcoma MG-63 cells: nuclear matrix downregulation and cytoplasmic trafficking of nucleophosmin[J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2008, 40(9): 1918-1929.
- [5] Colombo E, Alcalay M, Pelicci PG. Nucleophosmin and its complex network: a possible therapeutic target in hematological diseases[J]. *Oncogene*, 2011, 30(23): 2595-2609.
- [6] Yung BY. Oncogenic role of nucleophosmin/B23[J]. *Chang Gung Med J*, 2007, 30(4): 285-293.

- [7] Chiarella S, De Cola A, Scaglione GL, et al. Nucleophosmin mutations alter its nucleolar localization by impairing G-quadruplex binding at ribosomal DNA [J]. *Nucleic Acids Res*, 2013, 41(5): 3228-3239.
- [8] Shi SL, Liang Y, Li QF, et al. Localization of nucleophosmin in nuclear matrix and changes in its expression during the differentiation of human neuroblastoma induced by retinoic acid [J]. *J Cell Biochem*, 2010, 111(1): 67-74.
- [9] Li J, Sejas DP, Burma S, et al. Nucleophosmin suppresses oncogene-induced apoptosis and senescence and enhances oncogenic cooperation in cells with genomic instability [J]. *Carcinogenesis*, 2007, 28(6): 1163-1170.
- [10] Chen LY, Yang HB, Li QF, et al. Apoptosis of human esophageal carcinoma cell line EC9706 induced by curcumin [J]. *Progress in Modern Biomedicine*, 2008, 8(9): 1601-1604. (in Chinese)
陈兰英, 杨海波, 李祺福, 等. 姜黄素对人食管癌 EC9706 细胞凋亡的诱导作用 [J]. *现代生物医学进展*, 2008, 8(9): 1601-1604.
- [11] Liu F, Chen LY, Huang J, et al. Changes in expression and localization of heat shock protein 70 during curcumin-induced apoptosis of human esophageal cancer cells line EC9706 [J]. *Acta Anatomica Sinica*, 2012, 43(4): 490-499. (in Chinese)
刘凡, 陈兰英, 黄建, 等. 热休克蛋白 70 在人食管癌 EC9706 细胞凋亡过程中的表达与定位变化 [J]. *解剖学报*, 2012, 43(4): 490-499.
- [12] Shi SL, Li QF, Zheng YB, et al. The effects of combination of Chinese medicine effective constituents ginsenoside Rg1 on configuration and components of nuclear matrix of the osteosarcoma MG-63 cells during differentiation [J]. *Acta Anatomica Sinica*, 2008, 39(5): 670-676. (in Chinese)
石松林, 李祺福, 郑燕彬, 等. 人参皂甙 Rg1 组合对人成骨肉瘤 MG-63 细胞分化过程中核基质构型与蛋白质组成的影响 [J]. *解剖学报*, 2008, 39(5): 670-676.
- [13] Weng CH, Yung BY, Weng JJ, et al. Involvement of nucleophosmin/B23 in the cellular response to curcumin [J]. *J Nutr Biochem*, 2011, 22(1): 46-52.
- [14] Vassiliou GS, Cooper JL, Rad R, et al. Mutant nucleophosmin and cooperating pathways drive leukemia initiation and progression in mice [J]. *Nat Genet*, 2011, 43(5): 470-475.
- [15] Ryan JJ, Prochownik E, Gottlieb CA, et al. c-myc and bcl-2 modulate p53 function by altering p53 subcellular trafficking during the cell cycle [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1994, 91(13): 5878-5882.
- [16] Beham A, Marin MC, Fernandez A, et al. Bcl-2 inhibits p53 nuclear import following DNA damage [J]. *Oncogene*, 1997, 15(23): 2767-2772.
- [17] Kirsch DG, Doseff A, Chau BN, et al. Caspase-3-dependent cleavage of Bcl-2 promotes release of cytochrome c [J]. *J Biol Chem*, 1999, 274(30): 21155-21161.
- [18] Thompson J, Finlayson K, Salvo-Chirnside E, et al. Characterisation of the Bax-nucleophosmin interaction: the importance of the Bax C-terminus [J]. *Apoptosis*, 2008, 13(3): 394-403.

(编辑 安晓意)

(上接第210页)

六. 某些以-is 结尾的改变为-ides:

arthritis [α: 'θraitis]	arthritides [α: 'θritidi: z]	关节炎
dermatitis [ˌdɜ: mətə'taitis]	dermatitides [ˌdɜ: mətə'titidi: z]	皮炎
glottis [ˈglɒtɪs]	glottides [ˈglɒtidi: z]	声门
iris [ˈaɪərɪs]	irides [ˈiridi: z]	虹膜
meningitis [ˌmeni'dzaitis]	meningitides [ˌmɒni'dʒaidi: z]	脑脊膜炎

七. 以-x 结尾的改变为-ces:

apex [ˈeɪpeks]	apexes, apices [ˈeɪpisi: z]	尖端; 顶点
appendix [ə'pendɪks]	appendices [ə'pendis: z]	阑尾 附件
calyx [ˈkeɪlɪks]	calyces [ˈkeɪlisi: z]	肾盂; 萼
cervix [ˈsɜ: vɪks]	cervices [ˈsɜ: vɪsi: z]	颈部; 子宫颈
falx [ˈfælkɪks]	falces [ˈfælkɪsi: z]	镰
thorax [ˈθɔ: ræks]	thoraces [θɔ'reisi: z]	胸 胸腔 胸廓

八. 以-cyx 结尾的改变为-cyges:

coccyx [ˈkɒksɪks]	coccyges [kɒk'saidʒi: z]	尾骨
larynx [ˈlæɪŋks]	larynxes, larynges [lə'rɪndʒi: z]	喉
pharynx [ˈfæɪŋks]	pharynges [fə'rɪndʒi: z]	咽
salpinx [ˈsælpɪŋks]	salpinges [ˈsælpɪndʒi: z]	输卵管; 咽鼓管
varix [ˈvɛərɪks]	varices [ˈvɛərɪsi: z]	脉管曲张

九. 以-ion 结尾的改变为-ia:

criterion [kraɪ'tɪəriən]	criteria [kraɪ'tɪəriə]	标准; 准则
ganglion [ˈgæŋɡliən]	ganglia [ˈgæŋɡliə]	神经节; 腱鞘囊肿
gonion [ˈɡəʊniən]	gonia [ˈɡəʊniə]	下颌角点
mitochondrion [ˌmaɪtə'kɒndriən]	mitochondria [ˌmaɪtə'kɒndriə]	线粒体

《解剖学报》编辑部